

D1 (pages 3)

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.<sup>6</sup>

A61K 35/60

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96198763.4

[43] 公开日 1999 年 1 月 27 日

[11] 公开号 CN 1206348A

[22] 申请日 96.8.7 [21] 申请号 96198763.4

[30] 优先权

[32] 95.10.30 [33] US [31] 08/550,003

[86] 国际申请 PCT/CA96/00549 96.8.7

[87] 国际公布 WO97/16197 英 97.5.9

[85] 进入国家阶段日期 98.6.2

[71] 申请人 莱斯实验室阿特纳公司

地址 加拿大魁北克

[72] 发明人 E·都朋特 P·布拉茨奥 C·朱尼奥

D·H·马伊斯 K·马勒内斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 4 页 说明书 48 页 附图页数 26 页

[54] 发明名称 鲨鱼软骨提取物

[57] 摘要

本发明涉及软骨提取物及其生产方法。通过改进的方法可以获得具有抗血管生成、抗肿瘤、抗炎和抗溶胶原活性的鲨鱼提取物。该方法包括以下步骤：将鲨鱼软骨在水溶液中进行匀浆、分离匀浆为固体组分(固体提取物)和液体组分，液体组分进一步分级分离获得含有分子量包括 0—500kDa 之间分子的液体提取物。然后通过不同方式对液体提取物的组合物进行了研究。进一步分级分离该提取物产生一些其活性成分的初级特征。由于全液体提取物具有多种生物活性，可将其用于治疗多种疾病或病症，如由肿瘤增殖、血管生成、炎症和胶原溶解引起的疾病。基于液体提取物能够改善皮肤屏障功能，本发明的保护范围还包括化妆品的应用。该提取物对正常机体功能没有不良影响。因此，该鲨鱼提取物非常具有治疗价值前景。用于获得软骨提取物的方法简单而有效。通过该方法获得产品具有预料不到的价值，因而该方法是新的并且是非显而易见的。

(BJ) 第 1456 号

## 权 利 要 求 书

1. 一种获得软骨液体提取物的方法, 该液体提取物具有完整软骨中存在的大部分的生物活性水溶性成分, 所说方法包括以下步骤:
  - a) 在可以保持所述生物活性成分完整性的条件下, 将软骨匀化于含水溶液, 直至软骨粉碎为粒度低于或等于约  $500\mu\text{m}$  的颗粒, 得到含有所述生物活性成分的颗粒及粗液体提取物的混合物;
  - b) 离心所说的匀浆, 使颗粒和粗液体提取物分离;
  - c) 进一步分离粗液体提取物, 得到含有分子量低于或等于约 500 千道尔顿 (KDa) 的软骨分子的最终液体提取物; 并且
  - d) 浓缩所说的最终液体提取物, 由此基本上不损失所述液体提取物中存在的水溶性生物活性成分。
2. 如权利要求 1 定义的方法, 其中所述的条件包括, 步骤 a) 的操作温度在约  $0 - 20^{\circ}\text{C}$  之间, 步骤 b)、c) 和 d) 的操作温度在约  $0 - 10^{\circ}\text{C}$  之间。
3. 如权利要求 1 定义的方法, 其中所述的条件包括, 所述水溶液的操作 pH 范围为约  $6 - 8$ 。
4. 如权利要求 1 定义的方法, 其中步骤 a) 在 15 分钟 - 24 小时内完成。
5. 如权利要求 4 定义的方法, 其中步骤 a) 在 15 分钟 - 1 小时内完成。
6. 如权利要求 1 定义的方法, 其中所述软骨和含水溶液的比例为 1 公斤软骨至少约 1 升溶液。
7. 如权利要求 1 定义的方法, 其中所说的浓缩步骤 d) 通过用具有分子量截留值约  $0.1\text{KDa}$  的膜过滤来完成, 由此除去分子量低于截留值的分子。
8. 如权利要求 1 定义的方法, 其中所说的浓缩步骤 d) 包括所说最终液体提取物的冻干。
9. 如权利要求 8 定义的方法, 其中所说的冻干是在将稳定剂或保护剂加入到所述最终液体提取物的条件下进行的, 所加稳定剂或保护剂的量为足以保持所述生物活性成分完整性的量。
10. 如权利要求 8 或 9 定义的方法, 其中所说的软骨获得自鲨鱼。
11. 一种获得软骨液体提取物的方法, 该液体提取物具有完整软骨中存在的

## 制备软骨提取物

使用新鲜、解冻至 4℃ 或冷冻的干净软骨。然后让软骨和足够体积的水（相等量（重量/体积）约为最小体积，但可以增加而不对回收有价值成分得率产生任何影响）一起，在乙醇处理过的切肉机的孔间通过数次（具体说是三次）。从实际的观点来看，优选低体积，因为这样比并非必须的大体积更便于操作。实际当中，水要经过反相渗透并且经过 0.1 $\mu\text{m}$  滤器的过滤而纯化。许多含水溶液（例如包含盐）可以代替水使用。当希望回收到多种水溶性活性时，优选在中性 PH 附近和非变性条件下操作，以避免使某些软骨活性成分分解或变性。无法预知未知蛋白在含水溶剂中的状态；某些可能在酸性 PH 下更“适合”，而某些可能适于碱性 PH。另外，某些蛋白可能在温和变性条件下易提取，只要这种变性并非不可逆地影响含水溶液中这些蛋白的复性。为清楚起见，任何与保存生物活性水溶性软骨成分相容的提取条件，均属于本发明的保护范围。因此，将所有这些因素都考虑进去，在纯水中进行软骨活性成分的提取过程被证明是明智的选择，其回收具有非常良好的得率，回收的成分仍需要定义结构和特性。

然后用家用混合机在约 4℃ 下在最高速下搅拌 20 分钟，使混合物软骨/水匀化；在匀化过程中匀化温度升高至接近 20℃。当然，搅拌速度以及水溶液的体积会影响到提取的时间和得率。因此，匀化时间的合理范围（定义颗粒小于 500 $\mu\text{m}$ ）可以低至约 10 分钟，高至 24 小时，优选约 10 分钟-60 分钟。温度应当保持在约 10℃ 以下，以便当没有使用酶抑制剂时避免任何内生酶对活性成分的降解。理想的情况是，将温度定位到接近 0℃。通常因为这种实验是在温度保持在 4-10℃ 的冷室中进行的，所以这个范围的温度在本方法中被判定为可以接受的。为清除和简明起见，此后使用的术语“约 4℃”表示这个可接受范围的温度。

如果混合机不能足以减少颗粒的粒径，可以把匀浆放入 Polytron 粉碎机，在约 4℃ 下处理 10 分钟，从而进一步达到该匀浆的液化。或者，可以再次进行混合机-粉碎机过程，而将混合物简单匀化，这对我们来说，可以把 10 分钟的液化步骤节省下来。在完成匀化步骤时，剩余的颗粒粒径小于